

法政大学学術機関リポジトリ
HOSEI UNIVERSITY REPOSITORY

野菜類軟腐病細菌の生き残り戦略に関する研究

著者	森 怜
出版者	法政大学大学院理工学研究科
雑誌名	法政大学大学院紀要．理工学・工学研究科編
巻	60
ページ	1-3
発行年	2019-03-31
URL	http://doi.org/10.15002/00022121

野菜類軟腐病細菌の生き残り戦略に関する研究

STUDY ON SURVIVAL STRATEGY OF SOFT ROT DISEASE BACTERIA OF VEGETABLES

森 怜

Satoshi MORI

指導教員 濱本宏

法政大学大学院理工学研究科生命機能学専攻植物医科学領域修士課程

To control plant disease, understanding the life cycle of its pathogen is necessary. Especially, soil-borne pathogens can live long time under severe, starving conditions, such as in the soil, and it is important to elucidate their mechanism for the survival. We have been studying the Viable But Non-Culturable (VBNC) state of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc), a soil-borne pathogen which causes soft rot disease of many kinds of vegetable plants. VBNC is thought to be a kind of starvation adaptation. In this study, we examined the morphological changes of the bacterial cells when transferred to starving conditions, and analyzed the expression of four genes, which are regarded as starvation response genes by real time PCR.

Key Words : *Pectobacterium carotovorum*, morphological change, starving conditions, *relA*

1. 緒言

野菜類軟腐病細菌 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (以下 Pcc) は土壌伝染性の植物病原細菌であり、自然界、実験室いずれにおいても厳しい環境下で長く生き抜くことが知られる。以前より Pcc を用いて、飢餓環境適応の一種と考えられる VBNC (Viable But Non-Culturable) 状態の誘導などの研究を行ってきたが、特に作物が植えられていない土壌などの飢餓状況下で Pcc がどのように生き残るのかに興味を持たれた。本研究では、まず飢餓状態で Pcc の菌体に起こる形態的な変化を観察し、次いで飢餓応答遺伝子とされる 4 つの遺伝子の発現解析を行った。さらに、2018 年よりつくばの農研機構との共同研究のもとで、MAFF ジーンバンクに *Erwinia carotovorum* として保存される 293 株の菌株が利用可能となり、それらの株を比較しながら Pcc の飢餓状態における生き残り戦略について研究を行った。

2. 実験方法

(1) 飢餓環境における Pcc の形態的变化

Pcc (MAFF 211376 株を主として用いた)を LB 培地中で stationary phase まで液体培養し、集菌して滅菌 milliQ 水に懸濁し、25℃のインキュベータで静置した。経時的に NA 培地への接種、SYTOX/9 による生死判定、電子顕微鏡による形態の観察を行った。さらに近縁種であるジャガイモ黒あし病細菌 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* (以下 Pca)も含めて実験を行った。

(2) 飢餓遺伝子の発現量解析

滅菌 milliQ 水に Pcc を懸濁し飢餓処理を行った。経時的に菌体をサンプリングし、RNA Protect Bacteria Regent 処理し菌体内の RNA を安定化し、その後に RNeasy RNA 抽出キットを用い RNA 抽出を行った。リアルタイム PCR は Takara 社の One Step TB Green™ PrimeScript™ RT-PCR Kit キットを主に用いた。発現量解析した遺伝子は、ハウスキーピング遺伝子である *recA*、飢餓状態時に発現するとされる *relA*、*dps*、*cstA*、*rpoS* である。Santander らが 2014 年に *Erwinia amylovora* で用いているプライマー配列を参考に、Pcc 用改良しながらプライマーを設計してリアルタイム PCR に用いた。

表1 解析対象遺伝子と対応するプライマー

ターゲット遺伝子	名称	配列 (5' → 3')
cstA遺伝子	PriPccstAF	AATGCCGTGTGGTTAGTCGT
	PriPccstAR	GCGCCAATGCTGAGAGAATG
dps遺伝子	PriPcdpsF	GACGATCGCGCTGTAAACC
	PriPcdpsR	GTTGTTGGCGACAATCGCAT
relA遺伝子	PriPcrelAF	CTGGGTATTTCCAGCCAGCA
	PriPcrelAR	CTTCCGGGGCATCTTCACT
rpoS遺伝子	PriPcrpoSF	AATGATTCGGCGGAAGACGA
	PriPcrpoSR	AATCCACCAGTTGCGTAGG

(3) Pcc 株/旧 *Erwinia carotovorum* 株の保存培養性検定

60 日間純水中に懸濁・保存した旧 *Erwinia carotovorum* 293 株からまず 42 株を選び NA 培地に接種し、25℃・24 時間培養後生育の有無を観察した。また、保存株を SYTOX 染色し生死判定を行った。さらに、ハクサイに接種し、病原性の検定を行った。

(4) Pcc 株/旧 *Erwinia carotovorum* 株の *relA* 検出

保存培養性検定で、純水保存後に培養性が低下した株

について、そもそも飢餓応答/アラルモン合成酵素遺伝子である *relA* 配列をこれまで検定を行っていた株と同様に保持しているのかを PCR 検定した。プライマーはリアルタイム PCR 用のものとは別に新たに設計しコロニーPCRを用いて調べた。

3. 結果及び考察

(1) 飢餓環境における細菌の変化

Pcc および Pca を滅菌 milliQ 水に懸濁し飢餓環境にして約2か月間観察を行った(図1)。その結果、顕微鏡観察した細菌数は変化しないが、形成されるコロニー数は時間経過で少なくなっていくことが分かった。また、1~15日の間でPcc、Pca、60~75日の間でPcaのコロニー形成数が極端に減少することも確認された。SYTOX/9による生死判定を行ったが、どちらも違いは見られなかった。この結果からPcaに比べPccは培養性が落ちにくいと考えられた。

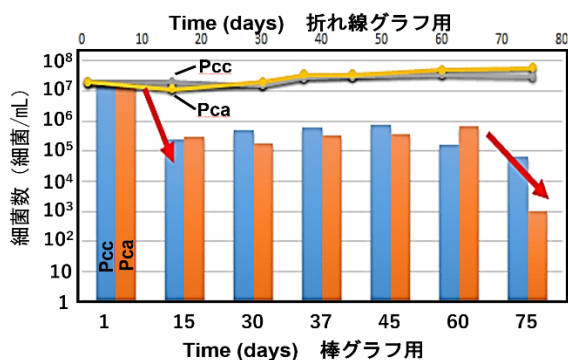


図1 光学顕微鏡で計数した細菌数(折れ線グラフ)およびNA培地上で形成されたコロニー数から計数した細菌数(棒グラフ)の変化

また、純水培養した細菌を電子顕微鏡(TEM)で観察した結果、日数経過により細菌の大きさが小さくなることも分かった(図2)。寒天培地からかきとり滅菌水に懸濁した直後の細菌は長径(長さ)が約20μmである(図2.A)のに対し、純水に懸濁し冷蔵保存した15日、45日後の菌体はそれぞれ18μm、13μmという結果となった(図2.B、C)。Pcaを観察した場合も日数経過により細菌の縮小および丸みを帯びることが確認された(図2.D、E)。また、日数が経過するにつれてべん毛の欠如した細菌の個体が多く見られた。球体に近づくことは、体積と表面積の比が小さくなるので、環境中から細胞内部が影響を受けにくくなると考えられ、きびしい環境に応答した形態ではないかと考えられた。

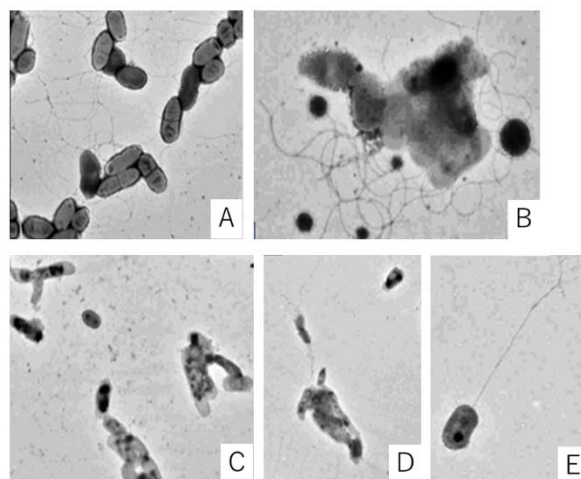


図2 透過型顕微鏡(TEM)による細菌の形態変化観察

A. 寒天培地からかきとり滅菌水に懸濁した直後の細菌(Pcc)、B. 純水に懸濁し冷蔵保存し15日後(Pcc)、C. 45日後(Pcc) D. 15日後(Pca) E. 45日後(Pca)

(2) 飢餓遺伝子の発現量の変化

細菌が飢餓状態時に発現するとされる遺伝子(*relA*、*cstA*、*dps*、*rpoS*)に着目して、リアルタイムPCR法にてRNA量を比較した(図3)。純水培養した細菌を用い1日、10日、20日後にリアルタイムPCRを行った結果、PccとPcaのRNA発現量に違いがあることが分かった。PccはPcaに比べて、日数経過によって飢餓遺伝子の発現量が増加しているが、Pcaは、発現量が減少しているステージがあった。図1で示したように、飢餓条件下でPccはPcaよりも長い期間培養性を保持するが、飢餓状態時に発現するとされる遺伝子の発現量の違いがその現象にかかわっている可能性が示された。また、病原性の遺伝子である*pel*やクオラムセンシングに関連する*expI*といった遺伝子は増加傾向にあり(結果は示さず)飢餓状態であっても、これらの株は病原性を保持できていると考えられ、実際、ハクサイ葉に接種すると容易に軟腐症状を起こす。

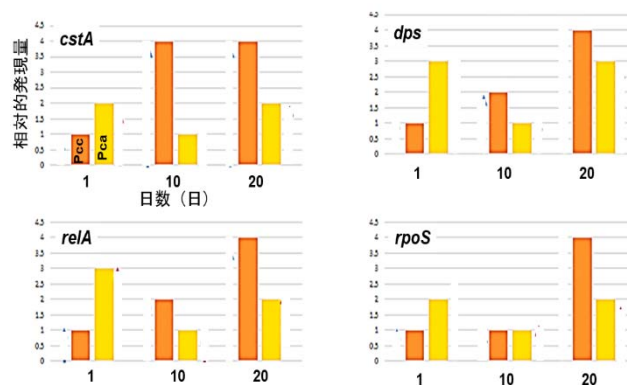


図3 日数経過による飢餓遺伝子発現量の変化

(3) 旧 *Erwinia carotovorum* 293 株の NA 培地上での培養性の検定

MAFF ジーンバンクより提供を受けた旧 *Erwinia carotovorum* 株 293 株のうち、先ず 42 株を選び (図 4)、滅菌 MiliQ 水懸濁処理をおおよそ 60 日間行った後、NA 培地に塗布して培養性を検定した。その結果 42 株のうち 3 株で極端な培養性の低下が確認された (図 5)。



図 4 飢餓応答実験に先ず供試した旧 *Erwinia carotovorum* 42 株 (囲ってある株)

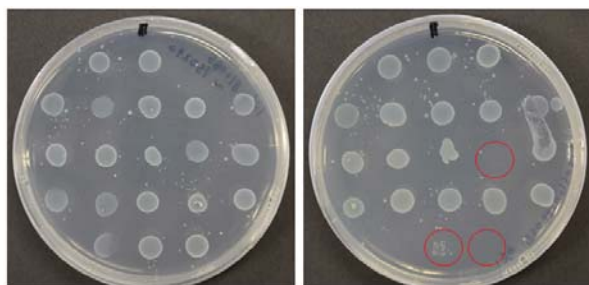


図 5 旧 *Erwinia carotovorum* 株の培養性検定

(4) Pcc における *relA* 配列の有無の PCR 検定

保存培養性検定で、純水保存後に培養性が低下した株について、そもそも飢餓応答/アラルモン合成酵素遺伝子である *relA* 配列をこれまで検定を行っていた株と同様に保持しているのかをコロニーPCR を用いて PCR 検定した。プライマーは、表 1 に示したリアルタイム PCR 用のものとは別に新たに設計した (表 2)。

表 2 設計した *relA* プライマーの配列

選択した 42 株に対して *relA* について PCR 検定を行った (表 3)。培養性に問題のあった株 3 つに関してはその

名称	配列 (5' --- 3')
moriRelApair2f	GGGTTTTTCATGATGGCGAGC
moriRelApair2r	GGTAACCTTCACGCTACCGCT
moriRelApair3f	CGCTCGACGGAGGATAGATT
moriRelApair4r	AAGATGACGTCACCCAGCAG

すべてが *relA* を保持していない (PCR 検定でバンドが検出されない) ことが分かった。しかし、培養性に問題がなかった株についても *relA* を保持していない株があった。その個体については、今回用いた PCR プライマーの組み合わせでは検出されない配列の存在や、あるいは別のタイプの飢餓遺伝子の存在の可能性なども踏まえて今後調べる必要がある。

土壌伝染性病原が厳しい環境下で長く生き抜く機構を明らかにし、さらに、その機構を阻害することが可能になれば、防除が困難とされる土壌伝染性病害に対処する手法の開発につながると考えられる。

表 3 *relA* プライマーを用いた PCR の結果

MAFF番号	分離源	採集県	採集年	培養性の問題	<i>relA</i> 配列のPCR検定
311551	ダイコン	青森	2007	なし	+
311552	ダイコン	青森	2008	なし	+
311635	ブロッコリー	長野	2011	なし	+
331057	ピーマン、シシトウ	大分	2012	なし	+
331058	ピーマン、シシトウ	大分	2012	なし	+
331059	ピーマン、シシトウ	大分	2012	なし	+
331060	ピーマン、シシトウ	大分	2012	なし	+
730152	トマト	福岡	2001	なし	+
730153	トマト	福岡	2001	なし	—
730154	トマト	福岡	2001	なし	+
730209	ダイコン	新潟	1977	なし	—
730210	ダイコン	新潟	1977	なし	+
730211	ダイコン	新潟	1977	なし	+
730212	ダイコン	新潟	1977	なし	+
730213	ダイコン	新潟	1977	あり	—
730214	レタス	新潟	1978	なし	+
730215	ダイコン	新潟	1978	なし	+
730216	ダイコン	新潟	1978	なし	+
730217	キャベツ	新潟	1979	なし	—
730218	キャベツ	新潟	1979	なし	+
730219	キャベツ	新潟	1979	なし	+
730220	キャベツ	新潟	1979	なし	+
730221	キャベツ	新潟	1979	あり	—
730222	ばれいしょ	群馬	1979	あり	—
730223	ばれいしょ	群馬	1979	なし	+
730224	カブ	新潟	1979	なし	+
730225	カブ	新潟	1979	なし	+
730243	キョウナ、ミズナ	埼玉	2005	なし	+
730244	キョウナ、ミズナ	埼玉	2005	なし	+
730245	キョウナ、ミズナ	埼玉	2005	なし	+
730277	合成B. napus	山口	2011	なし	+
730278	合成B. napus	山口	2011	なし	+
730279	合成B. napus	山口	2011	なし	+
730281	レタス	茨城	2012	なし	+
810017	カラやま桑	千葉	—	なし	+
810018	カラやま桑	兵庫	—	なし	+
810019	桑園土壌	鳥根	—	なし	+
810020	しま桑	沖縄	—	なし	—
810021	カラやま桑	兵庫	—	なし	+
810022	カラやま桑	兵庫	—	なし	+
810023	桑園土壌	三重	—	なし	+

参考文献

1. Santander, RD., Oliver, JD., and Biosca, EG. 2014 Cellular, physiological, and molecular adaptive responses of *Erwinia amylovora* to starvation. FEMS Microbiology Ecology 88(2) 258-271
2. 脇本哲 編 1994 総説植物病理学 細菌の培養・増殖・変異 pp 62-70, 株式会社養賢堂